

English Summary of the French patent FR 2 835 921

"The invention relates to the use of a device comprising a capacitive probe which is used to determine the biomass of small bacteria, such as lactic bacteria, during the culture thereof or during a fermentation process. The invention also relates to the corresponding method of determining the biomass".

FR2835921

Publication Title:

UTILISATION D'UNE SONDE CAPACITIVE POUR DETERMINER LA
BIOMASSE DE BACTERIES LACTIQUES

Abstract:

Abstract not available for FR2835921 Data supplied from the esp@cenet
database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 835 921**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **02 01629**

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 27/22, G 01 N 33/483, C 12 Q 1/04, 1/14

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 11.02.02.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.08.03 Bulletin 03/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *COMPAGNIE GERVAIS DANONE
Société anonyme — FR et FOGALE NANOTECH —
FR.*

⑦② Inventeur(s) : *TEISSIER PHILIPPE, BARBEAU
JEAN YVES et ARNOUX ANNE SOLENN.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ UTILISATION D'UNE SONDE CAPACITIVE POUR DETERMINER LA BIOMASSE DE BACTERIES LACTIQUES.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'un dispo-
sitif comprenant une sonde capacitive pour la détermination
de la biomasse de bactéries de petite tailles, telles les bac-
téries lactiques, au cours de leur culture ou lors d'un procé-
dé de fermentation. L'invention porte également sur le
procédé correspondant de détermination de la biomasse.

FR 2 835 921 - A1



5 **DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'un dispositif comprenant une sonde capacitive pour la détermination de la biomasse de bactéries de petite
10 tailles, telles les bactéries lactiques, au cours de leur culture ou lors d'un procédé de fermentation.

L'ART ANTERIEUR

15 La préoccupation majeure des industries alimentaires utilisant des ferments est la qualité et la performance de leurs fermentations.

L'une des variables principales dans un procédé de fermentation est la concentration de la biomasse dans le réacteur, c'est-à-dire la concentration des cellules
20 microbiennes, notamment les bactéries ou les levures dans le fermenteur, étant donné que la productivité est généralement directement proportionnelle à la biomasse.

Il est également très important de mesurer en temps
25 réel la concentration de la biomasse viable dans les fermenteurs pour minimiser les échantillonnages et les analyses de biomasse hors-ligne. Les méthodes conventionnelles indirectes d'estimation de la biomasse sont lentes et ne permettent bien souvent pas de
30 différencier la biomasse biologiquement active, c'est-à-dire viable de la biomasse morte (nécromasse). La plupart des méthodes plus récentes de mesure en ligne utilisent des sondes optiques qui mesurent la turbidité ou la

transmission de lumière et/ou la dispersion de la lumière à travers des suspensions cellulaires dans un milieu liquide ; le signal généré par ces sondes est proportionnel à la concentration en particules dans le bioréacteur, mais il ne permet pas de distinguer entre les cellules vivantes, mortes, les cristaux de sel, ou d'autres particules.

Plus récemment des sondes capacitives ont été développées qui permettent de mesurer la capacitance de suspension de cellules soumises à des radiofréquences basses (0,1 MHz à 10 MHz) qui est une fonction du volume des cellules viables (Harris et al., Enzyme Microb. Technol. Vol.9, Mars 1987). Ce type de sondes peuvent être insérées dans un bioréacteur et permettre une mesure en ligne de la biomasse viable dans des fermenteurs aussi bien industriels ou à l'échelle pilote sur des milieux de faible plage de conductivité (30 mS).

Jusqu'à présent, les sondes capacitives de l'art antérieur ont été utilisées pour déterminer la biomasse de cellules de grandes tailles telles les levures et les bactéries du genre *Escherichia coli*. Les mesures ne peuvent être effectuées que pour des cellules en grande quantité, et dans des milieux de concentration ionique définie. Ainsi EP281602 décrit ce type de sonde capacitive mais qui présente un certain nombre d'inconvénients car il ne permet pas d'obtenir directement un signal représentatif de la capacité indépendant de la fréquence d'excitation des électrodes. Il n'existe pas actuellement de moyen de suivre et de contrôler en ligne les étapes de préparation de la biomasse de bactéries telles que les bactéries lactiques, tout au long du procédé qui implique des modifications

continues de la teneur en sel. Ce procédé peut être réalisé de manière classique (aussi appelée "batch"), dans lequel le fermenteur est rempli avec le milieu de culture dans son intégralité, et ensuite inoculé avec le microorganismes. Durant la culture, on pilote la fermentation en utilisant comme paramètres d'action la température, la régulation du pH et parfois l'ajout manuel d'ingrédients de manière ponctuelle. Le procédé peut aussi être effectué en réacteur alimenté (ou "Fed batch"): dans ce mode de fermentation, le fermenteur est partiellement rempli avec le milieu de culture de base (environ 1/5 à 1/4 du fermenteur) et ensuite inoculé. Durant la culture, on pilote la fermentation par ajout continu de milieu de culture et de différents nutriments (d'où le nom de fed batch) ce qui permet d'ajuster en continu les concentrations en nutriments et de piloter la culture dans les conditions optimales de croissance du micro-organisme. A la fin de la fermentation, de par l'ajout progressif de milieu de culture, le fermenteur est rempli et on a atteint le volume de milieu que l'on a à l'instant initial dans le mode de culture batch. Les paramètres d'action comme la température, la régulation du pH ou l'ajout manuel d'ingrédients de manière ponctuels peuvent aussi être utilisés, mais sont moins importants; dans ce second mode, les variations de la teneur en sel sont plus importantes. Les sondes classiques sont adaptées pour des mesures de cellules de taille relativement élevée, dans des intervalles de conductivité restreints, qui ne sont pas compatibles avec les variations observées dans les procédés évoqués ci-dessus; les tentatives pour augmenter cette gamme de

conductivité se traduisent par une perte importante de sensibilité de la sonde.

La demande WO 01 79828 au nom de NANOTEC SOLUTION décrit une sonde remédiant à certains de ces
5 inconvénients, qui est notamment utilisée pour mesurer le taux de sel dans du saumon ou du jambon pour déterminer l'état de fraîcheur de ces produits.

De manière inattendue, on a maintenant trouvé que la sonde décrite dans la demande WO 0179828, qui est
10 incorporée ici par référence, pouvait être appliquée au contrôle de l'efficacité du procédé et du maintien de la qualité et de la viabilité de la biomasse de cellules de petite taille telles que les bactéries lactiques, au cours des différentes étapes. La présente invention se
15 propose de fournir un moyen de mesure de la biomasse de cellules microbiennes de petite taille, c'est-à-dire dont la surface est inférieure à $10 \mu\text{m}^2$, telles par exemple les bactéries lactiques, en particulier les streptocoques et les lactobacilles, car à ce jour aucun moyen précis
20 fiable efficace et reproductible n'a été développé pour mesure le contenu en biomasse de bactéries lactiques dans une culture en temps réel. L'utilisation d'un capteur en ligne de biomasse permettrait de maîtriser, d'optimiser et de conduire les fermentations en vue d'augmenter la
25 quantité et la qualité du produit final et de satisfaire les conditions de production, notamment dans le domaine agroalimentaire.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

30

La présente invention concerne l'utilisation d'un dispositif, et sa mise en œuvre lors de la conduite de

procédés de culture, comprenant une sonde capacitive pour la détermination de la biomasse de cellules vivantes dont la surface cellulaire est inférieure ou égale à $10 \mu\text{m}^2$, la dite sonde étant prévue pour être appliquée, de préférence immergée, dans un milieu contenant les dites cellules, et la dite sonde comprenant (i) une première paire d'électrodes d'intensité pour injecter un courant électrique dans le dit milieu, (ii) une seconde paire d'électrodes de tension pour relever la tension appliquée au dit milieu, et (iii) des moyens pour mesurer le courant électrique injecté. De préférence, le dit dispositif comprend en outre un conditionneur comprenant (i) des moyens pour fournir une tension alternative isolée galvaniquement à appliquer entre lesdites électrodes d'intensité et, (ii) des moyens pour traiter des signaux représentatifs du courant injecté dans le dit milieu et de la tension relevée aux bornes des électrodes de tension, de façon à délivrer des signaux respectivement de mesure de la capacité et de la conductance du dit milieu. Les moyens de traitement comprennent (i) un pont de mesure par méthode de zéro agencé pour traiter un signal image du courant injecté et un signal image de la tension relevée appliqués respectivement à une branche de référence et à deux branches d'opposition, et (ii) des moyens pour commander automatiquement ce pont à partir du signal de mesure de conductance. Selon la présente invention, le pont de mesure par méthode de zéro est disposé en aval de circuits délivrant des signaux images respectivement du courant injecté et de la tension aux bornes de l'impédance à mesurer. Un tel agencement permet de résoudre des problèmes d'isolement et de précision, car

l'agencement permet un montage en pont flottant et une amplification préalable des signaux de mesure délivrés par la sonde.

Dans un mode particulier de réalisation, le pont de mesure comporte :

- une branche de référence incluant une résistance de référence sur laquelle est appliqué le signal image du courant injecté,
- une première branche d'opposition incluant une résistance d'opposition réglable et une seconde branche d'opposition incluant un condensateur d'opposition réglable sur lesquelles est appliqué le signal image de la tension relevée, et,
- des moyens amplificateurs ayant leur entrée reliée aux dites branches de référence et d'opposition et délivrant un signal de mesure de zéro.

Dans un dispositif selon l'invention comprenant en outre des moyens pour délivrer un signal image de la tension aux bornes de la seconde paire d'électrodes et des moyens pour délivrer un signal image du courant injecté dans la première paire d'électrodes, le conditionneur comprend en outre dans la première branche d'opposition un premier modulateur dont l'entrée est reliée à la sortie des moyens pour délivrer le signal image de tension, ce premier modulateur étant commandé par le signal de mesure de conductance de sorte que le signal de mesure de zéro est sensiblement nul. Dans un mode préféré de réalisation, la sonde comprend quatre fils reliant respectivement les quatre électrodes d'injection de courant et de mesure de tension à quatre bornes de moyens de connexion avec le conditionneur, et deux fils supplémentaires reliant respectivement les

bornes d'une résistance de mesure de courant disposée à l'intérieur de la sonde à deux autres bornes desdits moyens de connexion. La résistance de la mesure de courant est par exemple insérée entre l'une des 5 électrodes d'injection de courant et l'un des fils supplémentaires relié via les moyens de connexion à une masse flottante du conditionneur, et est de préférence disposée à proximité des électrodes de la sonde. Cet agencement particulier de la sonde de mesure présente 10 comme avantage le fait que cette sonde est entièrement passive et n'inclut pas d'amplificateur, ce qui permet de concevoir des sondes de très faible diamètre, par exemple d'un diamètre de 12mm. De plus, le conditionneur du dispositif selon l'invention peut être aisément contrôlé 15 en remplaçant la sonde de mesure par un étalon passif constitué d'une résistance et d'une capacité. Les moyens de commande automatique peuvent en outre être agencés pour commander le pont à partir du signal de mesure de capacité. Le conditionneur comprend alors en outre un 20 second modulateur inséré entre la sortie des moyens pour délivrer le signal image de tension et le condensateur d'opposition, ledit second modulateur étant commandé par le signal de mesure de capacité de sorte que le signal de mesure de zéro est sensiblement nul. Dans un mode 25 pratique de réalisation du dispositif selon l'invention, les moyens de traitement comprennent en outre, en sortie du pont de mesure, respectivement un premier et un second canal comprenant chacun des moyens de détection synchrone et des premiers intégrateurs délivrant respectivement les 30 signaux de mesure de capacité et de conductance, ces moyens de détection synchrone étant commandés par le signal de sortie des moyens oscillateurs. La sonde ne

comprend que des composants passifs et est connectée de façon amovible au conditionneur. Le conditionneur comprend en outre un premier et un second amplificateurs différentiels reliés électriquement à la sonde et prévus
5 pour délivrer respectivement le signal de courant et le signal de tension.

Les sondes capacitives selon l'invention comprennent de préférence quatre électrodes. Les deux électrodes extérieures émettent un courant alternatif à fréquence
10 variable pouvant être prédéterminée. Ce courant crée un champ électrique aux environs des électrodes qui permet de polariser les cellules vivantes. Les deux électrodes intérieures mesurent la différence de potentiel (tension) du milieu dans lequel les cellules vivantes se trouvent
15 en suspension.

Un exemple de dispositif ou de sonde capacitive selon l'invention est décrit dans la demande internationale de brevet WO0179828 au nom de la société NANOTEC SOLUTION (France). Ce dispositif comprend trois parties : le MCU
20 9400 (Multisensor Control Unit) destiné à acquérir, traiter, visualiser et mémoriser ou transmettre vers un ordinateur les informations provenant de la sonde capacitive, le pré-amplificateur qui contient l'ensemble des composants électroniques, et la sonde capacitive
25 constituée d'un corps cylindrique en inox (diamètre 25 mm) munie à son extrémité de quatre électrodes en platine disposées en parallèle.

Selon un mode préféré de réalisation, le courant électrique injecté dans le milieu par la dite sonde a une
30 fréquence comprise entre 0,1 MHz et 10 MHz, de préférence entre 0,1 et 1 MHz.

Le milieu selon l'invention contenant les dites cellules est un milieu aqueux liquide, plus ou moins fluide. Le milieu de suspension des cellules, notamment des bactéries, susceptible d'être mis en œuvre dans la présente invention, est de préférence un milieu aqueux de culture contenant les nutriments nécessaires à la survie et/ou à la croissance des cellules en suspension. Des exemples de nutriments sont, des sources de carbone, tel le glucose, du phosphore, de l'azote et d'autres sources de nutriments essentiels. Des exemples de milieux de cultures sont donnés dans les exemples ci-après. Le LB broth constitue un exemple de milieu de culture synthétique bactérien bien connu. Le milieu de culture peut également être un milieu végétal, notamment les jus végétaux. Le milieu de suspension des cellules peut aussi être un liquide alimentaire, par exemple le lait, les ferments lactiques, un yaourt ou une crème lactée.

Selon un mode préféré de réalisation, la conductance du dit milieu est comprise entre 2 et 400 mS, de manière préféré entre 20 et 200 mS. De manière préférée, la conductance du dit milieu varie dans la plage comprise entre 2 et 400 mS, dans un intervalle de 250 mS. Lorsque le dispositif selon l'invention est mis en œuvre pour mesurer de faible variation de la capacitance, par exemple de l'ordre d'environ 0,1 à 0,5 pF, la mesure est réalisée dans les milieux à conductivité comprise entre 2 mS et 400 mS. La conductance du milieu peut être ajustée par adjonction de sel au dit milieu, pour que la conductance du milieu se situe dans cette gamme. Le sel utilisé doit être compatible avec les cellules en culture et est par exemple du chlorure de sodium (NaCl) ou du chlorure de potassium (KCl).

La présente invention fournit également la correspondance entre la capacité en pF mesurée par le dispositif selon l'invention et la concentration en cellules vivantes en g/l de milieu ; celle-ci est donnée par la relation :

5 1 pF équivaut à environ 0,05 g/l à 0,4 g/l de cellules vivantes, notamment de bactéries vivantes, dans le milieu selon le type de cellules, notamment de bactéries, présentes dans le milieu.

Selon un mode préféré de réalisation, les cellules
10 vivantes sont des bactéries lactiques vivantes, telles des lactobacilles, dans ce cas la dite relation est par exemple 1 pF équivaut à environ 0,2 g/l de lactobacilles vivants dans le milieu.

La présente invention se rapporte également à un
15 procédé pour déterminer les caractéristiques d'une biomasse de cellules vivantes dont la surface cellulaire est inférieure ou égale à $10 \mu\text{m}^2$, le dit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 20 a) injection d'un courant alternatif à fréquence prédéterminée dans un milieu contenant les dites cellules, via une première paire d'électrodes immergées dans le dit milieu;
- b) mesure du courant injecté dans le dit milieu,
- c) mesure de la tension aux bornes d'une seconde
25 paire d'électrodes immergées dans ledit milieu et disposées à proximité des électrodes d'injection de courant, et
- d) traitement des signaux images respectivement du
30 courant injecté dans le dit milieu et de la tension relevée aux bornes des électrodes de tension, de façon à délivrer des signaux

respectivement de mesure de la capacité et de la conductance du dit milieu.

De préférence, le procédé de l'invention est mise en œuvre en utilisant le dispositif selon l'invention, et
5 notamment la sonde capacitive. Ce procédé se caractérise en ce que la plage de mesure de la conductance est comprise entre 1 mS et 1000 mS. De manière préférée, la plage de mesure de la conductance s'étend de 2 à 400 mS, et de manière encore plus préférée entre 20 à 200 mS. Le
10 procédé peut comprendre en outre une étape d'ajustement de la conductance du milieu par adjonction de sel, tel NaCl ou KCl ; ainsi par exemple 0,5 g/l de NaCl en solution dans de l'eau correspond à une conductance de 1 mS. La correspondance entre la quantité de sel dans l'eau
15 et la conductance est aisément déterminée par l'homme du métier.

La mesure de faible variation de la capacitance, de l'ordre d'environ 0,1 à 0,5 pF, en mettant en œuvre le procédé de l'invention, est réalisée dans les milieux à
20 conductivité comprise entre 2 mS et 400 mS.

Les fréquences pour mesurer la biomasse sont de préférence les fréquences pour lesquelles la dispersion bêta est essentiellement complète (voir figure 1) et pour lesquelles la dispersion alpha est négligeable. La sonde
25 capacitive selon l'invention est utilisée de préférence sur toute la gamme de fréquence correspondant à la dispersion beta (0,1 à 10 MHz), mais les fréquences de mesure optimales pour les cellules de petites tailles de l'invention sont de préférence comprise entre 0,1 MHz et
30 1 MHz.

En outre, le procédé selon l'invention peut comporter une étape d'étalonnage de la sonde capacitive en fonction

de la température du milieu et de la conductance du milieu. La température du milieu de culture est adaptée pour permettre la survie et/ou la croissance des cellules ; elle est de préférence comprise entre 0 et 5 50°C, de préférence elle est d'au moins 20°C, de manière préférée la température est de l'ordre de 37°C.

Le procédé est caractérisé en ce que le traitement des signaux de courant et de tension inclut une méthode de zéro mettant en œuvre un pont de mesure comprenant 10 d'une part une branche de référence sur laquelle le signal image du courant est appliqué, et d'autre part, deux branches d'opposition sur lesquelles le signal image de la tension est appliqué, ces branches d'opposition comprenant respectivement une composante résistive 15 réglable et une composante capacitive réglable, et ce pont de mesure étant automatisé pour délivrer un signal de mesure de capacité et un signal de mesure de conductance du milieu.

Ainsi, dans la présente invention, la mesure de la 20 résistance et de la capacité du milieu est déterminée par une méthode de zéro, à partir de l'action qu'il est nécessaire de faire pour annuler la partie réelle et la partie imaginaire du courant passant à travers la biomasse. Pour un exposé du principe général de mesure 25 d'impédance par méthode de zéro avec mise en œuvre de quatre électrodes, on pourra se référer à l'article « Four-electrodes null techniques for impedance measurement with high resolution » de H.P. SCHWAN et C.D. FERRIS dans la publication « The Review of Scientific 30 Instruments (vol.39, N°4, Avril 1968).

Le procédé de l'invention ainsi que le dispositif ou la sonde capacitive selon l'invention peuvent être

utilisés pour une large gamme de cellules de petite
taille pouvant être les cellules de plantes, d'animaux ou
des cellules microbiennes et dans un grand nombre de
procédés de fermentation. De préférence, le procédé de
5 l'invention est applicable aux cultures microbiennes
contenant des bactéries, des levures ou des cellules
fongiques. Le procédé selon l'invention est
essentiellement applicable à des cultures microbiennes
contenant des cellules de petites tailles, de préférence
10 des cellules procaryotes, notamment des bactéries. Ces
bactéries de petites tailles ont généralement une forme
sphérique ou coccoïde, ou une forme de bâtonnet spiralée
ou hélicoïdale, elle sont sous une forme sporulée ou non.
Par bactéries de petites tailles, on entend que leur
15 taille est nettement inférieure à celle de bactéries de
grande taille telles *Escherichia coli* ou du genre
Bacillus. Parmi les bactéries, susceptibles d'être mises
en œuvre dans un procédé de la présente invention ou
utilisées avec le dispositif ou la sonde capacitive de la
20 présente invention, il convient de citer de manière non
exhaustive :

- Les bactéries lactiques, notamment les
lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques
et leuconostoc,
- 25 - Les bifidobactéries,
- Les rickettsies,
- Les chlamidies,
- Les mycoplasmes.

Parmi les lactobacilles, il convient de citer
30 *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*,
Lactobacillus casei. Parmi les Streptocoques, il convient
de citer *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus*

*aquafilus, Streptococcus aquaticus, Streptococcus
stearothermophilus.*

Plus particulièrement par cellules de petites
tailles, on entend désigner des cellules, notamment des
5 bactéries dont la surface cellulaire n'excède pas $10\ \mu\text{m}^2$.
De manière préférée, Les cellules ou bactéries de petite
taille selon l'invention ont une surface inférieure ou
égale à $7\ \mu\text{m}^2$. Egalement, le diamètre des cellules ou des
bactéries de l'invention, sous forme sphérique ou de
10 bâtonnet, est inférieur ou égal à $0,7\ \mu\text{m}$. De préférence
le diamètre est inférieur ou égal à $0,5\ \mu\text{m}$.

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente
invention, les cellules de l'invention sont en général
cultivées dans un bioréacteur, ou fermenteur dans lequel
15 la détermination de la biomasse des dites cellules, de
préférence des bactéries, est réalisée en ligne. Le
procédé de fermentation peut être réalisé dans n'importe
quel type de fermenteur, que se soit un fermenteur
industriel à gros volume ou un fermenteur de laboratoire.
20 De préférence, la sonde capacitive est attachée et/ou
immergée dans le fermenteur utilisé dans le procédé selon
l'invention pour permettre une mesure directe en ligne.
Le procédé pourra notamment être appliqué à des
fermentations classiques en batch, ou en milieu continu
25 (avec soutirage, en cours de culture, de milieu remplacé
par du milieu neuf); il sera particulièrement avantageux
pour le suivi de fermentations de type "fed batch". En
particulier, la mesure pourra être effectuée en présence
d'une agitation du milieu.

30 La présente invention se rapporte donc à
l'utilisation d'un procédé selon l'invention pour suivre,
contrôler, adapter, surveiller la fermentation de

cellules vivantes, de préférence de bactéries lactiques, dont la surface cellulaire est inférieure ou égale à $10 \mu\text{m}^2$. Ces bactéries ou cellules pourront être détectées à partir de concentrations de l'ordre de 10^6 ufc/ml, tout
 5 au long des différentes étapes du procédé impliquant des conductances de 0,01 à 400 mS, sans modification de la sonde.

La résolution de la sonde telle que définie dans la présente invention est donnée par le tableau suivant:

| | Résolution en Capacitance | Gamme de Conductance |
|--|---------------------------|--|
| Moyenne sur 10 mesures (temps d'acquisition = 0,5s) | 0,1 pF | Supérieur ou égal à 0,001 Ms |
| Moyenne sur 100 mesures (temps d'acquisition = 5s) | 0,03 pF | Inférieur à 0,001 mS et supérieur à $10 \mu\text{S}$ |
| Moyenne sur 1000 mesures (temps d'acquisition = 50s) | 0,01 pF | Inférieur ou égal à $10 \mu\text{S}$ |

10

La résolution de la sonde capacitive selon l'invention est de l'ordre de 0,1 pF dans les milieux à conductivité supérieure ou égale à 0,001 mS.

15 Enfin, la présente invention se rapporte à l'utilisation d'un procédé selon l'invention pour mesurer l'efficacité de concentration des cellules tout en

maintenant leur viabilité. Egalement, la présente invention se rapporte à l'utilisation d'un procédé selon l'invention pour mesurer le taux de sel, notamment de chlorure de sodium, dans un milieu.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après.

10

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Dispersions électriques.

15 Figure 2 : Représentation de la sonde avec ses quatre électrodes en platine.

Figure 3 : Etalonnage de la sonde - Capacitance en fonction de la conductance pour différentes températures.

20 Figure 4 : Propagation *Lb casei* sur milieu synthétique et microfiltration tangentielle - Delta C, conductance et DO en fonction du temps.

25 Figure 5: Propagation de *Lb. bulgaricus* sur milieu synthétique- Delta C, conductance et DO en fonction du temps.

Figure 6: Préculture de *St. thermophilus* sur milieu synthétique entre 4.10^6 et 10^9 ufc/ml- Delta C et DO en fonction du temps.

30

EXEMPLES

1 - PRINCIPE

5 Le principe de mesure de la quantité de biomasse s'appuie sur les propriétés diélectriques passives des cellules biologiques, notamment des bactéries lactiques. En effet, la membrane cytoplasmique des cellules, constituée d'une double couche lipidique, est très peu
10 conductrice. Elle permet de délimiter clairement l'interface entre le milieu intérieur et le milieu extérieur dans lequel les cellules sont en suspension.

 Ainsi sous l'influence d'un champ électrique, les membranes cellulaires se polarisent comme les surfaces
15 d'un condensateur électrique. Les ions positifs vont vers l'électrode négative et les ions négatifs vont vers l'électrode positive.

1.1. Mesure de la capacitance

20

 L'accumulation de ces charges peut être quantifiée par la mesure de capacitance (capacité) de la suspension (notée C et exprimée en pico-Farads, pF). Plus la quantité de charges accumulées est grande, plus la
25 quantité de biomasse présente est importante ; on peut donc relier directement la mesure de capacitance à la mesure de biomasse.

 La capacitance est une mesure de l'amplitude de polarisation induite par un champ électrique et ne dépend
30 pas de la direction de ce champ. Par contre, elle est fonction de la fréquence. Un champ électrique change de

direction lentement à basse fréquence, par contre, il change rapidement de direction à haute fréquence.

L'effet de la fréquence du signal sur la polarisation des membranes cellulaires est décrit ci-après. Quand la
5 fréquence est basse, le champ change de direction relativement lentement, donc la plupart des ions ont le temps de rejoindre la surface de la membrane et de la polariser avant que le champ ne change de direction et la polarise à l'inverse. La capacitance est alors élevée.
10 Quand la fréquence est plus élevée, moins d'ions ont le temps de rejoindre la membrane avant que le champ électrique ne change de sens. Comme la polarisation est moindre, la capacitance est plus faible. Enfin, quand la fréquence est très élevée, les ions n'ont pas le temps de
15 polariser la membrane ; ainsi la capacitance mesurée est due uniquement au milieu et plus particulièrement à la rotation des dipôles de l'eau.

On peut donc différencier trois paliers de fréquence, appelés les dispersions électriques (cf. figure 1).

20 La dispersion α centrée dans le domaine des fréquences audio (kHz), est due à la relaxation tangentielle des ions de la double couche électrique des surfaces chargées des cellules (GRAM+ essentiellement en raison de la structure particulière de leur enveloppe).

25 La dispersion γ centrée dans le domaine des très hautes fréquences (GHz), est essentiellement due à la mise en rotation des dipôles des molécules d'eau.

La dispersion β centrée dans le domaine des fréquences radio (MHz), est le résultat de la
30 polarisation de la membrane des cellules. Elle est perceptible pour des fréquences allant de 100 kHz à 10 MHz.

Ainsi, si on soustrait la valeur de capacitance résiduelle du milieu C_{∞} à la capacitance C radio, on obtient la différence de capacitance, notée delta C (ΔC) qui peut être corrélée à la quantité de biomasse présente dans la suspension.

$$\Delta C = C \text{ radio} - C_{\infty}$$

Les cellules dont la membrane n'est pas intègre, ne sont pas polarisées et donc ne contribuent pas au signal de capacitance mesuré. Ainsi, la mesure obtenue par la sonde est spécifique des cellules viables.

1.2. Mesure de la conductance

La sonde utilisée dans la présente invention nous donne de préférence également la mesure de la conductance du milieu (notée G et exprimée en milli Siemens mS). La conductance est l'inverse de la résistance (R) de la solution et elle dépend de la surface (S) des électrodes et de leur écartement.

$$G = 1/R = \kappa \cdot S/l$$

κ représente la conductivité spécifique (en $mS \cdot m^{-1}$).

La conductance donne une information sur la composition ionique du milieu, car le transport du courant dans les solutions est assuré uniquement par les ions.

Ainsi, la conductance représente donc l'habilité qu'à un milieu à transporter un courant électrique, tandis que la capacitance représente l'habilité à stocker une charge électrique.

5

2 - MATERIELS ET METHODES

2.1. L'appareil de mesure

10 L'appareil de mesure utilisé dans la présente invention est de préférence fabriqué par la société Fogale Nanotech (France) ; il est constitué de trois parties :

- le MCU 9400 (Multisensor Control Unit de chez 15 Fogale Nanotech) destiné à acquérir, traiter, visualiser et mémoriser ou transmettre vers un ordinateur les informations provenant du capteur,

- le pré ampli qui contient tous les composants électroniques,

- 20 - la sonde, constituée d'un corps cylindrique en inox (diamètre 25 mm) et munie à son extrémité de quatre électrodes en platine disposées en parallèle.

Les deux électrodes extérieures émettent un courant alternatif à fréquence variable. Ce courant crée un champ 25 électrique aux environs des électrodes, qui permet de polariser les cellules vivantes. Les deux électrodes intérieures mesurent la différence de potentiel de la suspension (figure 2).

La sonde est stérilisable et dispose d'un système de 30 nettoyage électrolytique qui permet d'éliminer tout dépôt à la surface des électrodes.

2.2. Etalonnage de la sonde de mesure

Il est nécessaire de tracer les courbes d'étalonnage de la sonde afin de pouvoir ensuite effectuer les
5 corrections nécessaires aux résultats obtenus. En effet, la valeur de la capacitance (ΔC) dans un milieu contenant uniquement de l'eau n'est pas nulle, et, de plus, elle varie en fonction de la conductance du milieu et de sa température.

10 C'est pourquoi, les inventeurs ont tracé les courbes d'étalonnage pour différentes températures, ΔC en fonction de la conductance.

La sonde est maintenue par une pince reliée à un support métallique. Elle est plongée dans de l'eau ultra
15 pure dans un bêcher d'un litre, de façon oblique afin d'éviter l'accumulation de bulles d'air sur les électrodes. Le bêcher est placé sur un agitateur magnétique dans un bain-marie. On ajoute progressivement une masse connue de chlorure de sodium à l'eau.
20 Températures étudiées : 30°C, 37°C et 42°C.

La conductance varie linéairement en fonction de la concentration en sel du milieu. On remarque également que pour une même concentration en sel, la conductance varie en fonction de la température.

25 Le ΔC varie d'une part en fonction de la conductance, et d'autre part avec la température du milieu (figure 3).

Pour chaque suivi de capacitance, un calcul correcteur est nécessaire afin de s'affranchir des effets de la conductance et de la température. Il est donc
30 nécessaire de soustraire aux mesures de capacitance obtenues lors d'un suivi de croissance, la valeur du ΔC

étalonnage correspondant à la même température et à la même conductance.

On lit sur l'appareil : $\Delta C_{lu} = 30 \text{ pF}$ et $G = 100 \text{ mS}$, à $T = 30^\circ\text{C}$.

5 Sur la courbe d'étalonnage à 30°C , on lit que pour $G = 100 \text{ mS}$, $\Delta C_{\text{étalonnage}} = 20 \text{ pF}$. Donc la valeur corrigée est $\Delta C = 30 - 20 = 10 \text{ pF}$.

Ici, la plage de mesure possible de conductance s'étend de 20 mS à 400 mS , car au-delà de 400 mS le
10 signal de la sonde sature, et en dessous de 20 mS la mesure devient de moins en moins précise.

La nature de la sonde utilisée dans la présente invention dépend de préférence de la conductivité du milieu dans lequel s'effectue la mesure. Ainsi, pour les
15 milieux faiblement conducteurs, il peut être intéressant de disposer d'une sonde ayant une gamme de conductance allant de 10 à 100 mS . Pour des mesures effectuées dans des milieux fortement conducteurs, il peut être intéressant de disposer d'une sonde ayant une gamme de
20 conductance allant jusqu'à 400 mS .

2.3. Composition des milieux utilisés

25

2.3.1. Gélose M17 (AES laboratoire)

| | | |
|----|---------------------------------|--------|
| | Tryptone | 2.5 g |
| | Peptone pepsique de viande | 2.5 g |
| | Peptone papaïnique de soja | 5.0 g |
| 30 | Beta-glycérophosphate de sodium | 19.0 g |
| | Lactose | 5.0 g |
| | Extrait de levure | 2.5 g |

| | | |
|---|----------------------|--------|
| | Extrait de viande | 2.5 g |
| | Sulfate de magnésium | 0.25 g |
| | Acide ascorbique | 0.5 g |
| | Agar | 15 g |
| 5 | Eau distillée Qsp | 1 L |

2.3.2. Gélose PDA (AES laboratoire)

| | | |
|----|---------------------------|------|
| | Extrait de pomme de terre | 5 g |
| | Glucose | 20 g |
| 10 | Agar | 17 g |
| | Eau distillée qsp | 1 L |

2.3.3. Gélose MRS (AES laboratoire)

| | | |
|----|------------------------|--------|
| 15 | Polypeptone | 10 g |
| | Extrait de levure | 5 g |
| | Extrait de viande | 10 g |
| | Glucose | 20 g |
| | Phosphate dipotassique | 2 g |
| 20 | Acétate de sodium | 5 g |
| | Citrate d'ammonium | 2 g |
| | Sulfate de manganèse | 0.05 g |
| | Tween 80 | 1.0 g |
| | Agar | 15 g |
| 25 | Eau distillée Qsp | 1 L |

2.3.4. Composition du milieu synthétique pour la propagation de *Lactobacillus bulgaricus*

30 Il s'agit d'un milieu standard M 17, décrit au paragraphe 2.3.1, sans Agar.

3. EXEMPLE 1 : ANALYSE DE LA PROPAGATION DE LACTOBACILLUS
CASEI SUR MILIEU SYNTHETIQUE

Le milieu synthétique utilisé pour la propagation de
5 Lb. Casei est le milieu MRS ou le milieu décrit par
Sejong Oh, Sungsue Rheem, Jaehun Sim Sangkyo Kim Youngjin
Baek (Appl. env. Microbiology 11, 1995, p3809-3814)

La propagation en batch de Lb. casei est réalisée en
fermenteur B. Braun 15 L. La sonde est placée en bas de
10 cuve. La température est maintenue à 37°C. L'agitation
est fixée à au moins 200 rpm. Le pH est régulé à 6.5 par
ajout de soude. Elle est suivie d'une étape de
concentration par filtration ou centrifugation.

La densité optique (DO) est lue à $\lambda = 580$ nm et les
15 dénombrements sur boîte sont réalisés sur milieu MRS
neutre (Man Rogosa Sharpe) à l'aide d'un ensemenceur
spiral.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4
qui présente le suivi de la biomasse réalisé en continu
20 lors de la propagation de Lb. casei sur milieu
synthétique.

La sonde permet de suivre l'accroissement de la
biomasse vivante entre $2 \cdot 10^7$ ufc/ml et $5 \cdot 10^{10}$ ufc/ml
(soit 50 g/l) en cours de culture, et jusqu'à $5 \cdot 10^{11}$
25 ufc/ml après concentration. Les valeurs de capacitance
sont parfaitement corrélées aux mesures de densité
optique lors des différentes étapes de filtration et de
lavage.

De plus, on remarque que la conductance du milieu
30 nous permet de mesurer l'efficacité du lavage, car plus
la quantité de sel diminue dans le milieu moins il est
conducteur.

En plus de l'indication quantitative de biomasse vivante, la sonde permet d'une part, de mesurer et de contrôler l'efficacité du lavage et de la concentration via la mesure de conductance, et d'autre part, donne une
5 information sur l'état physiologique des bactéries (viabilité).

10 **4. EXEMPLE 2 : ANALYSE DE LA PROPAGATION DE LACTOBACILLUS
DELBRUECKII SSP. BULGARICUS SUR MILIEU SYNTHETIQUE**

La propagation en batch de *Lb. bulgaricus* sur milieu synthétique est réalisée en fermenteur B. Braun 15L. La sonde est placée en bas de cuve. La température est
15 maintenue à 42°C. Le pH est régulé à 6,2 par ajout de soude durant les quatre premières heures uniquement (cf. matériels et méthode paragraphe 2.3.4). L'agitation est fixée à 200 rpm. La densité optique est lue à $\lambda = 580$ nm.

La figure 5 présente les résultats du suivi de
20 croissance de *Lb. Bulgaricus*. La sonde détecte la présence ainsi que la croissance de *Lb. Bulgaricus* entre 10^8 et 5.10^9 ufc/ml, pour des conductances de 2 à 35mS.

25 **5. EXEMPLE 3 : ANALYSE DE LA PROPAGATION DE
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS SUR MILIEU SYNTHETIQUE**

Le suivi de croissance de *Streptococcus thermophilus* est réalisé en batch. La température est régulée à $T=42^\circ\text{C}$
30 et le milieu est agité à 200 rpm. La densité optique est lue à $\lambda = 580$ nm et les dénombrements sur boîte sont réalisés sur milieu M17 lactose.

La figure 6 présente le suivi de la croissance de *Streptococcus thermophilus* en fonction du temps. La densité optique, et la capacitance, évoluent de la même manière. Le suivi de la croissance de *Streptococcus*
5 *thermophilus* sur milieu synthétique est réalisé sur la gamme de population 4.10^6 à 10^9 ufc/ml à l'aide de la sonde de capacitance même si le signal de capacitance est faible. Afin d'obtenir une meilleure résolution, on pourra filtrer le signal.

10 Le tracé de la capacitance en fonction de la densité optique fait apparaître une relation linéaire entre ces deux mesures.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un dispositif comprenant une sonde
5 capacitive pour la détermination de la biomasse de
cellules vivantes dont la surface cellulaire est
inférieure ou égale à $10 \mu\text{m}^2$, la dite sonde étant prévue
pour être appliquée dans un milieu contenant les dites
cellules, et la dite sonde comprenant (i) une première
10 paire d'électrodes d'intensité pour injecter un courant
électrique dans le dit milieu, (ii) une seconde paire
d'électrodes de tension pour relever la tension appliquée
au dit milieu, et (iii) des moyens pour mesurer le
courant électrique injecté.

15

2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisé en ce
que le dit dispositif comprend en outre un conditionneur
comprenant :

- 20 i. des moyens de fournir une tension alternative
isolée galvaniquement à appliquer entre lesdites
électrodes d'intensité;
- ii. des moyens pour traiter des signaux représentatifs
respectivement du courant injecté dans le dit
milieu et la tension relevée aux bornes des
25 électrodes de tension, de façon à délivrer des
signaux respectivement de mesure de la capacité et
de la conductance du dit milieu.

3. Utilisation selon les revendications 1 à 2
30 caractérisée en ce que le courant électrique injecté dans
le milieu par la dite sonde a une fréquence comprise
entre 0,1 MHz et 10 MHz.

4. Utilisation selon les revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la résolution de la sonde est de l'ordre de 0,1 pF dans les milieux à conductivité supérieure ou égale à 0,001 mS.

5
10 5. Utilisation selon la revendication 1 à 4 caractérisée en ce que la conductance du dit milieu est comprise entre 2 et 400 mS.

6. Utilisation selon la revendication 1 à 5 caractérisée en ce que la conductance du dit milieu varie dans la plage comprise entre 2 et 400 mS, dans un intervalle de 250 mS.

15 7. Utilisation selon la revendication 1 à 6 caractérisé en ce que la mesure de faible variation de la capacitance, de l'ordre d'environ 0,1 à 0,5 pF, est réalisée dans les milieux à conductivité comprise entre 2
20 mS et 400 mS.

8. Utilisation selon la revendication 1 à 7 caractérisée en ce que la conductance du dit milieu est ajustée par adjonction de sel au dit milieu.

25 9. Utilisation selon les revendications 1 à 8 caractérisée en ce que le dit milieu est sélectionné parmi les milieux synthétiques, le lait, les milieux végétaux, les yaourts, les crèmes lactées.

30 10. Utilisation selon les revendications 1 à 9 caractérisée en ce que la dite cellule est une bactérie

choisie dans le groupe composé des bactéries lactiques, des bifidobactéries, des Rickettsies, des Chlamydies, des Mycoplasmes.

5 11. Utilisation selon la revendication 10 caractérisée en ce que la dite bactérie lactique est sélectionnée dans le groupe composé des lactobacilles, des streptocoques, des leuconostoc, des lactocoques.

10 12. Utilisation selon la revendication 11 caractérisée en ce que la dite lactobacille est sélectionnée dans le groupe composé de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*.

15 13. Utilisation selon la revendication 11 caractérisée en ce que le dit streptocoque est sélectionné dans le groupe composé de *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus aquaticus*, *Streptococcus aquafilus*, *Streptococcus stearo*
20 *thermophilus*.

14. Utilisation selon la revendication 1 à 13 caractérisée en ce que la correspondance entre la capacité en pF mesurée par le dit dispositif et la
25 concentration en cellules vivantes en g/l de milieu est donnée par la relation : 1 pF équivaut à environ 0,05 g/l à 0,4 g/l de cellules vivantes dans le milieu.

15. Utilisation selon la revendication 11 à 12
30 caractérisée en ce que la correspondance entre la capacité en pF mesurée par le dit dispositif et la concentration en lactobacilles vivants en g/l de milieu

est donnée par la relation : 1 pF équivaut à environ 0,2 g/l de lactobacilles vivants dans le milieu.

16. Procédé pour déterminer les caractéristiques d'une
5 biomasse de cellules vivantes dont la surface cellulaire est inférieure ou égale à $10 \mu\text{m}^2$, le dit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 10 a) Injection d'un courant alternatif à fréquence prédéterminée dans un milieu contenant les dites cellules, via une première paire d'électrodes immergées dans le milieu ;
- b) mesure du courant injecté dans le dit milieu,
- c) mesure de la tension aux bornes d'une seconde
15 paire d'électrodes immergées dans ledit milieu et disposées à proximité des électrodes d'injection de courant, et
- d) traitement des signaux images respectivement du courant injecté dans le dit milieu et de la
20 tension relevée aux bornes des électrodes de tension, de façon à délivrer des signaux respectivement de mesure de la capacité et de la conductance du dit milieu.

17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce
25 que la plage de mesure de la conductance est comprise entre 1 mS et 1000 mS.

18. Procédé selon la revendication 17 caractérisé en ce
que la plage de mesure de la conductance s'étend de
30 préférence de 2 à 400 mS.

19. Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que la plage de mesure de la conductance s'étend de préférence de 20 à 200 mS.

5 20. Procédé selon les revendications 16 à 19 caractérisé en ce que la mesure de faible variation de la capacitance, de l'ordre d'environ 0,1 à 0,5 pF, est réalisée dans les milieux à conductivité comprise entre 2 mS et 400 mS.

10

21. Procédé selon les revendications 16 à 20 comprenant en outre l'étape d'ajuster la conductance du dit milieu par adjonction de sel.

15 22. Procédé selon les revendications 16 à 21 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape d'étalonnage de la sonde capacitive en fonction de la température du milieu et de la conductance du milieu.

20 23. Procédé selon les revendications 16 à 22 caractérisé en ce que la dite cellule est une bactérie sélectionnée dans le groupe composé des bactéries lactiques, des bifidobactéries, des rickettsies, des chlamydies, des mycoplasmes.

25

24. Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce que la dite bactérie lactique est sélectionnée dans le groupe composé des lactobacilles, des streptocoques, des leuconostoc, des lactocoques.

30

25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que la dite lactobacille est sélectionnée dans le groupe

composé de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*,
Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus delbrueckii*.

26. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce
5 que le dit streptocoque est sélectionné dans le groupe
composé de *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus*
aquafilus, *Streptococcus* stéarothermophilus,
Streptococcus aquaticus.

10 27. Procédé selon les revendications 16 à 26 caractérisé
en ce que la correspondance entre la capacité en pF
mesurée et la concentration en cellules vivantes en g/l
de milieu est donnée par la relation : 1 pF équivaut à
environ 0,05 g/l à 0,4 g/l de cellules vivantes dans le
15 milieu.

28. Procédé selon les revendications 24 et 25 caractérisé
en ce que la correspondance entre la capacité en pF
mesurée et la concentration en lactobacilles vivants en
20 g/l de milieu est donnée par la relation : 1 pF équivaut
à environ 0,2 g/l de lactobacilles vivants dans le
milieu.

29. Procédé selon les revendications 16 à 28 caractérisé
25 en ce que les dites cellules sont cultivées en fermenteur
selon un mode de conduite batch, fed batch ou continu.

30. Procédé selon la revendication 29 caractérisé en ce
que la détermination de la biomasse vivante des dites
30 bactéries est réalisée en ligne.

31. Procédé selon les revendications 16 à 30 caractérisé en ce que le dit milieu est sélectionné dans le groupe composé des milieux synthétiques, les jus végétaux, du lait, des ferments lactiques, des yaourts.

5

32. Utilisation d'un procédé selon les revendications 16 à 31 pour suivre la fermentation de cellules vivantes dont la surface cellulaire est au moins inférieure ou égale à $10 \mu\text{m}^2$, de préférence des bactéries lactiques.

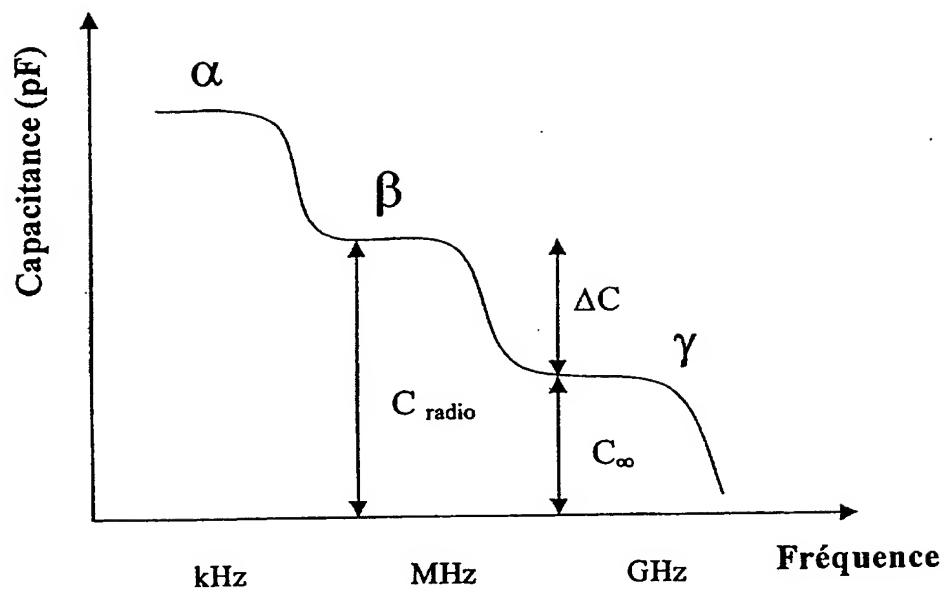


Figure 1

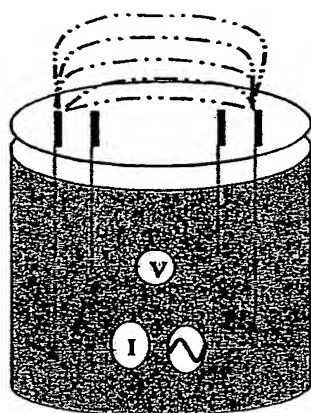


Figure 2

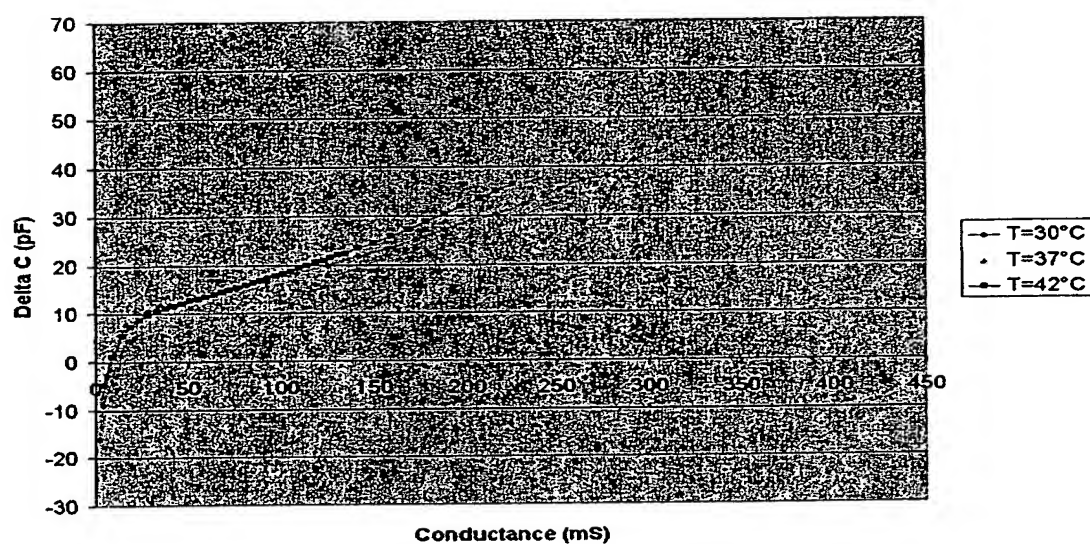


FIGURE 3

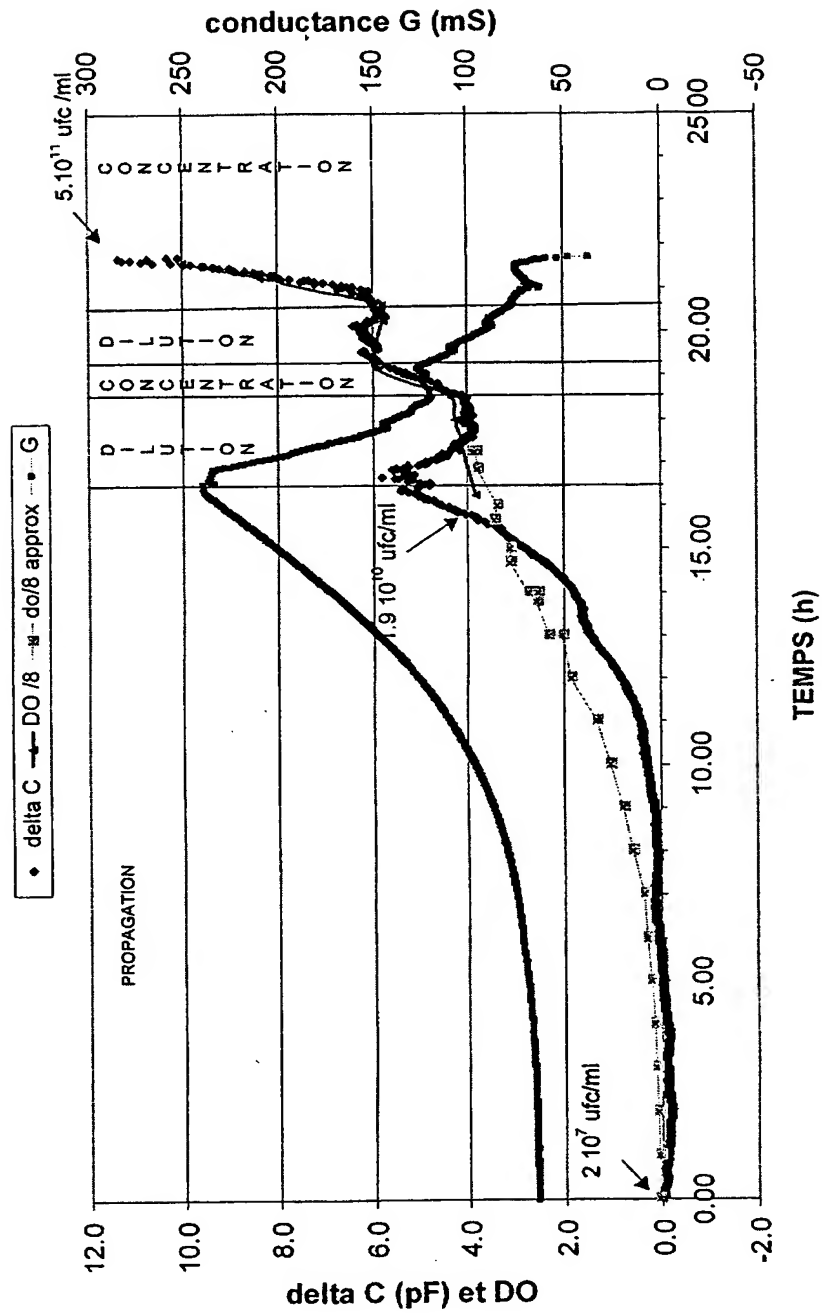


FIGURE 4

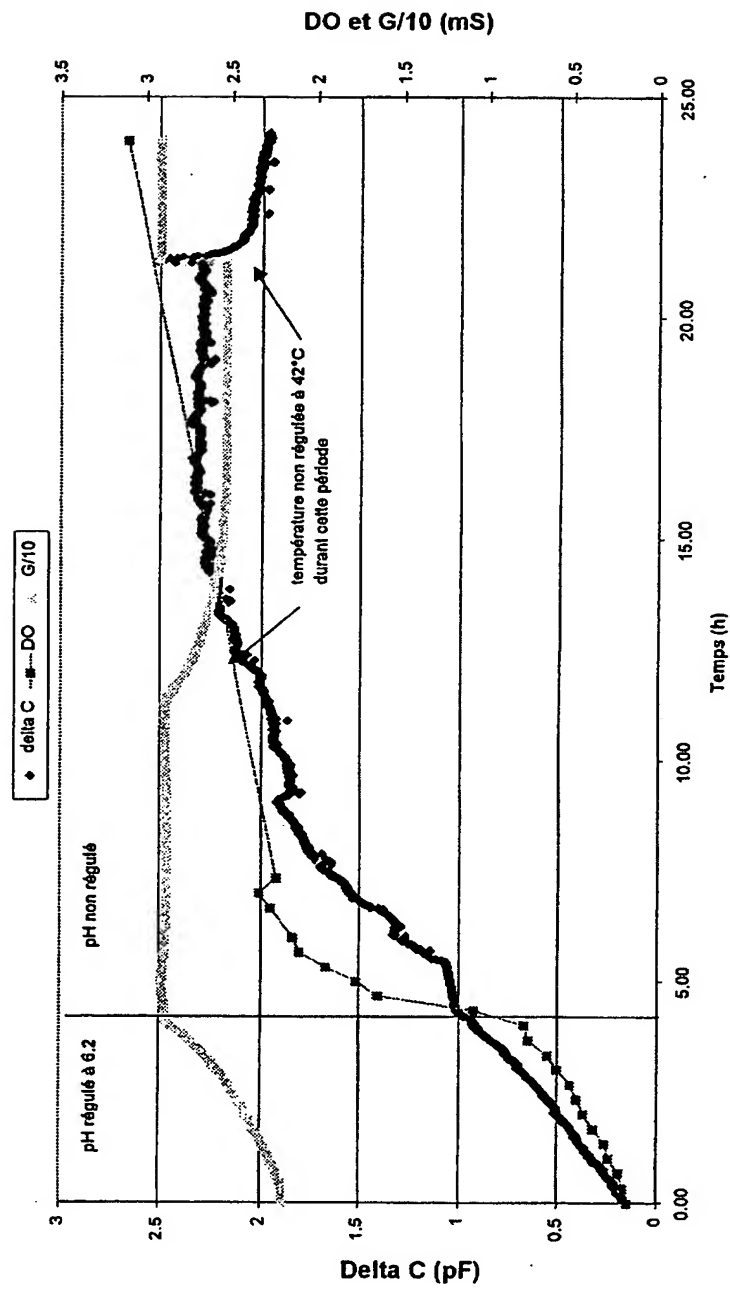


FIGURE 5

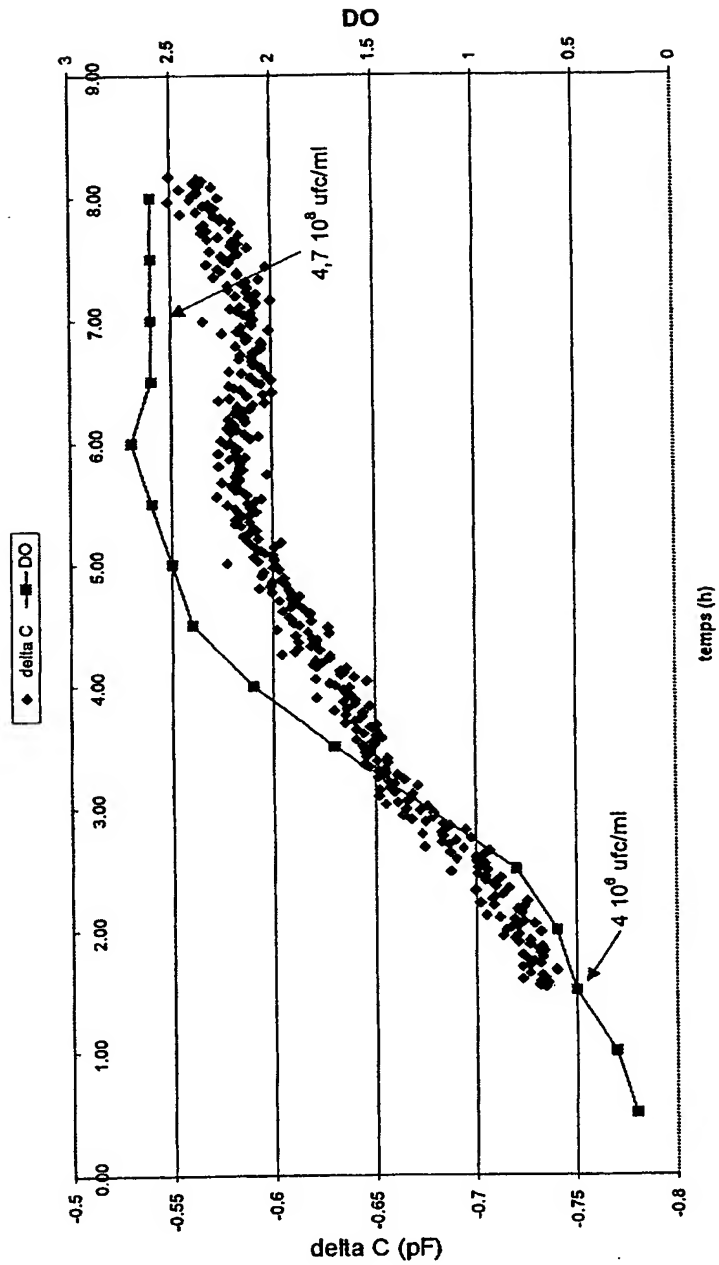


FIGURE 6



2835921

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 614361
FR 0201629

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendication(s) concernée(s) | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|---|---|----------------------------------|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| D,X | WO 01 79828 A (OSSART FREDERIC ; NANOTEC SOLUTION (FR)) 25 octobre 2001 (2001-10-25) * page 2 - page 8; figure 1 * | 1,2,16 | G01N27/22 G01N33/483 C12Q1/04 C12Q1/14 |
| X | EP 1 138 758 A (NTE S A) 4 octobre 2001 (2001-10-04) * page 5, ligne 11 - ligne 45 * | 1,3 | |
| D,X | EP 0 281 602 A (TODD ROBERT WILLIAM ; KELL DOUGLAS BRUCE (GB)) 14 septembre 1988 (1988-09-14) * le document en entier * | 1,3 | |
| A | EP 1 085 316 A (ABER INSTR LTD) 21 mars 2001 (2001-03-21) * page 2 - page 3 * | 1,16 | |
| A | US 4 965 206 A (KELL DOUGLAS B) 23 octobre 1990 (1990-10-23) * le document en entier * | 1,16 | |
| A | EP 0 277 789 A (KOBE STEEL LTD) 10 août 1988 (1988-08-10) * le document en entier * | 1,16 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) G01N C12M C12Q |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 12 novembre 2002 | | Joyce, D | |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | | |

1
EPO FORM 1503 12.89 (P04C14)

2835921

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0201629 FA 614361**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12-11-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|------------------------|----|---|------------------------|
| WO 0179828 | A | 25-10-2001 | FR | 2812725 A1 | 08-02-2002 |
| | | | AU | 5234601 A | 30-10-2001 |
| | | | WO | 0179828 A1 | 25-10-2001 |
| EP 1138758 | A | 04-10-2001 | EP | 1138758 A1 | 04-10-2001 |
| EP 0281602 | A | 14-09-1988 | AT | 62071 T | 15-04-1991 |
| | | | AU | 593387 B2 | 08-02-1990 |
| | | | AU | 7881087 A | 24-03-1988 |
| | | | CA | 1261393 A1 | 26-09-1989 |
| | | | DE | 3768942 D1 | 02-05-1991 |
| | | | EP | 0281602 A1 | 14-09-1988 |
| | | | WO | 8802115 A1 | 24-03-1988 |
| | | | NZ | 221878 A | 27-09-1989 |
| | | | US | 4810650 A | 07-03-1989 |
| | | | ZA | 8706972 A | 22-03-1988 |
| EP 1085316 | A | 21-03-2001 | EP | 1085316 A2 | 21-03-2001 |
| | | | GB | 2354588 A | 28-03-2001 |
| US 4965206 | A | 23-10-1990 | AT | 98775 T | 15-01-1994 |
| | | | AU | 609058 B2 | 26-04-1991 |
| | | | AU | 7881187 A | 24-03-1988 |
| | | | CA | 1307824 A1 | 22-09-1992 |
| | | | DE | 3788515 D1 | 27-01-1994 |
| | | | DE | 3788515 T2 | 21-04-1994 |
| | | | EP | 0282532 A1 | 21-09-1988 |
| | | | WO | 8802114 A1 | 24-03-1988 |
| | | | NZ | 221877 A | 27-09-1989 |
| | | | ZA | 8706971 A | 28-12-1988 |
| EP 0277789 | A | 10-08-1988 | JP | 2117395 C | 06-12-1996 |
| | | | JP | 7117511 B | 18-12-1995 |
| | | | JP | 63191046 A | 08-08-1988 |
| | | | JP | 1067200 A | 13-03-1989 |
| | | | JP | 1884829 C | 10-11-1994 |
| | | | JP | 6009519 B | 09-02-1994 |
| | | | JP | 1124399 A | 17-05-1989 |
| | | | JP | 1736742 C | 26-02-1993 |
| | | | JP | 4025800 B | 01-05-1992 |
| | | | AT | 76436 T | 15-06-1992 |
| | | | DE | 3871168 D1 | 25-06-1992 |
| | | | EP | 0277789 A2 | 10-08-1988 |
| | | | US | 5182193 A | 26-01-1993 |

EPO FORM P0485

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82